

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## **AGENT FOR MAINTAINING SURVIVAL OF NERVE CELL**

**Patent number:** JP11292774  
**Publication date:** 1999-10-26  
**Inventor:** SHIMIZU YOSHIHARU; NAKAJIMA KAZUhide; OKAMURA AI  
**Applicant:** AGRICULTURE FORESTRY AND FISHERIES TECHNICAL INFORMATION SOCIETY  
**Classification:**  
- **international:** A61K35/64; A61K38/00; A61K38/00  
- **european:**  
**Application number:** JP19980111373 19980408

### **Abstract of JP11292774**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject maintaining agent useful as an additive to culture media for culturing nerve cells or their tissue or as a medicine for treating or preventing Alzheimer's disease, Parkinson's disease, etc., accompanying neurodegeneration by adding a life protein originating from *Drosophila melanogaster*.

**SOLUTION:** This maintaining agent contains a life protein originating from *Drosophila melanogaster*. The life protein can be obtained from the early chrysalis of the *Drosophila melanogaster*. The life protein can be obtained as a protein having a mol.wt. of 77,000 by treating the homogenate supernatant of the early chrysalis of *Drosophila melanogaster* by anion exchange column chromatography such as DEAE-Sephacel, Con-A column chromatography and gel filtration. The obtained life protein may be compounded with a pharmaceutical carrier, etc., (for example, a binder, a vehicle) to prepare a proper preparation. The life protein may be used as a food additive used in health foods/drinks.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-292774

(43) 公開日 平成11年(1999)10月26日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

A 6 1 K 35/64

38/00

識別記号

A A B

A A M

F I

A 6 1 K 35/64

C 0 7 K 14/435

A 6 1 K 37/02

A A B

A A M

// C 0 7 K 14/435

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平10-111373

(22) 出願日

平成10年(1998)4月8日

(71) 出願人 591142389

社団法人農林水産技術情報協会

東京都中央区日本橋兜町15-6

(72) 発明者 清水 義治

東京都東大和市狭山3-1207-15

(72) 発明者 中島 和英

神奈川県鎌倉市七里ヶ浜東2-34-10

(72) 発明者 岡村 愛

神奈川県相模原市弥栄2-16-16

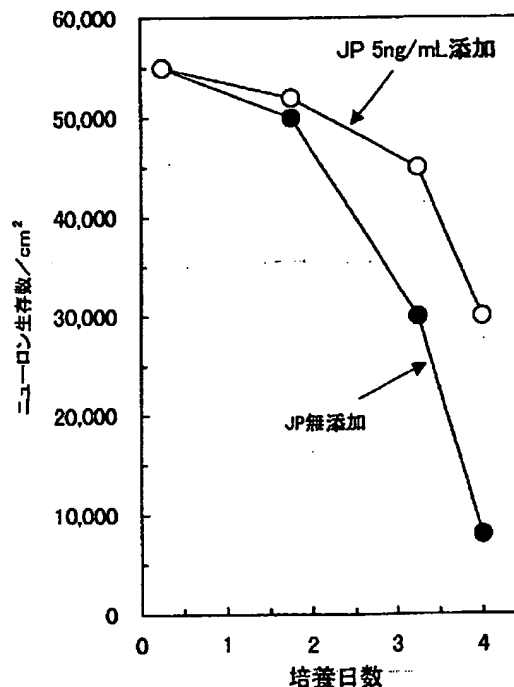
(74) 代理人 弁理士 山田 文雄 (外1名)

(54) 【発明の名称】 神経細胞生存維持剤

(57) 【要約】

【構成】 キイロショウジョウバエ由来の寿命タンパク質 (J P) を含有することを特徴とする神経細胞生存維持剤。

【作用と効果】 神経細胞の生存を維持し、その神経突起の形成/発達を促進する。神経細胞の細胞培養、組織培養の培地添加物として有用である。また、神経変性を伴う各種疾患 (例えばアルツハイマー病や、パーキンソン病など) の治療薬或いは予防薬としての用途が期待できる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 キイロショウジョウバエ由来の寿命タンパク質を含有することを特徴とする神経細胞生存維持剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、キイロショウジョウバエ由来の寿命タンパク質を含有する神経細胞生存維持剤に関するものである。

## 【0002】

【発明の背景】寿命タンパク質(Ju-myo Protein、以下JPとも云う)は、近代寿命遺伝学の理論に基づき寿命遺伝子(Jm)の発現産物として、最初にキイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の発生初期の蛹から見出された分子量77,000のタンパク質であり、経口投与により動物の寿命を延長するという希有な効果を持つことが知られている(特公平7-91319号)。この寿命タンパク質は、従来考えられていた老化機構が老化遺伝子を想定して加齢によりこれが発現するものとしていたのに対し、キイロショウジョウバエに関する一連の遺伝学的研究から寿命を制御する主遺伝子Jm(ju-myo)遺伝子の発見されたことに基づき、その発現産物の探索から見出されたものである(Yonemura et al., Heredity, 66, 143(1991); Okano et al., Hereditas, 117, 251(1992))。

【0003】この寿命タンパク質は、キイロショウジョウバエでは、寿命遺伝子が機能発現して個体寿命が分化する時期と考えられる幼虫期後半から蛹期前半にかけて多量に出現する。その後急速に減少し、羽化後以降は体内から消失する。その分子量はSDS-PAGE上で約77,000、等電点は約pH6.5、糖含量は約3.3%(ヘキサース含量)である。

【0004】寿命タンパク質が、どのようにして動物の寿命を延長させるのか、その生物学的活性、生理学的機構について詳しくはまだ分かっていない。今回、発明者らの探求過程において、寿命タンパク質を培養神経細胞に添加したところ、その生存を維持する作用があることを発見した。

【0005】本発明はこのような知見に基づきなされたものであり、神経細胞の生存を維持する培養添加剤として、また神経変性を伴う疾患(例えば神経細胞の変性脱落を主要な病変とするアルツハイマー病や、パーキンソン病など)の治療薬或いは予防薬としての用途を提供するものである。

## 【0006】

【発明の目的】本発明は、神経細胞の生存を維持する神経細胞生存維持剤を提供することを目的とする。

## 【0007】

【発明の構成】本発明は、キイロショウジョウバエ由来の寿命タンパク質を含有することを特徴とする神経細胞

生存維持剤である。

【0008】寿命タンパク質は、特公平7-91319号の方法に従って、キイロショウジョウバエの初期の蛹より得ることができる。具体的には、蛹ホモジネート上清をDEAE-セファセルなどの陰イオン交換カラムクロマトグラフィ、Con-Aカラムクロマトグラフィ、さらにゲル濾過により、分子量77,000のタンパク質として得ることができる。

【0009】得られた寿命タンパク質は、通常用いられる医薬担体(結合剤、賦形剤など)を用いて適当な製剤としてもよい。また健康食品/飲料に用いる食品添加剤として使用することもできる。また神経細胞の組織培養において培養添加剤として使用することができる。

## 【0010】

【実施例1】特公平7-91319号記載のの方法に従って、寿命タンパク質を精製した。すなわちキイロショウジョウバエの初期の蛹約20gを集め、氷冷PBS中でホモジナイズして抽出後、遠心により上清を得た。透析によりバッファー交換し、DEAE-セファセルカラムにアプライした。50 mM Tris-HCl緩衝液(pH8.2)、400 mM Tris-HCl緩衝液(pH8.2)でカラム洗浄した後、0.5 M NaCl含有500 mM Tris-HCl緩衝液(pH8.2)で溶出する画分を集めた。この画分を限外濾過により濃縮後、Con-Aセファロースカラムにアプライし、2~3時間リサイクルした。0.5 M NaCl含有20 mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)でカラム洗浄後、0.2 M  $\alpha$ -メチル-D-マンノシドを含む0.5 M NaCl含有20 mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で溶出する画分を集めた。この画分を濃縮後、ゲル濾過カラム(Superose-6)にかけて、分子量77,000の画分を集め最終精製品とした。蛹約20gから1回の精製工程で約7.4mgの寿命タンパク質(JP)を得た。これを数次繰返し、必要量を集め1/4濃度PBS溶液とした。

## 【0011】

【実施例2】ラット胎仔脳神経細胞(ニューロン)の培養に対するJPの効果、以下のようにして調べた。発生18日目のウィスター系ラット胎仔(胚)から大脳皮質を取り出し、髄膜を除去し細断した後、0.25%トリプシン及び20mg/mLのDNaseを含有するPBS(リン酸緩衝生理食塩水)中で37°C、25分間インキュベートした。トリプシン処理した組織細片をピペettingにより単細胞に分散した後、10%FBS(牛胎児血清)を添加したDulbecco's MEM/F-12培地に懸濁し、 $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>の割合でポリ-L-リジンコートしたシャーレにまいて培養した。初期培養6時間によりシャーレ底面に細胞層を形成させた後、無血清培地(Dulbecco's MEM/F-12)に培地交換し非付着細胞を除去した。その後は2日おきに同無血清培地に更新した。JP添加群として、初期培養6時間後の培地切換え時及びその後の培地更新時に、を0.005 ng/mL、0.5 ng/mL、5 ng/mL、50 ng/mLの各濃度のJP(実施例1で得た寿命タンパク質)を含有する無

血清培地 (Dulbecco's MEM/F-12) を使用した。

【0012】培養した神経細胞は位相差顕微鏡像を確認すると共に、生存細胞数を計測するためMAP2 (微少管結合タンパク質2) に対する特異抗体を使用して免疫組織化学的染色を行った。すなわち、培養細胞を4%パラホルムアルデヒド含有磷酸緩衝液 (pH7.4) で20分間固定した後、PBSで洗浄し、マウス抗MAP2モノクローナル抗体を加え4℃、48時間反応させた。PBSにて洗浄後、ビオチニル化抗マウスIgG抗体 (2次抗体) を1時間反応させ、同様にPBSで洗浄後アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (Vectastain ABC Kit) を反応させた。さらにPBSで洗浄後、DAB発色液 (0.5 mg/mL 3,3'-ジアミノベンジジン3塩酸、0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.1 M 酢酸緩衝液、pH7.0) にて発色させて、顕微鏡下観察した。この抗MAP2抗体染色により、生存神経細胞の核を判定し単位面積あたりの細胞数を計測した。

【0013】図1は、このようにして培養した神経細胞の培養4日目の顕微鏡写真図である。図1の上部2枚の写真は位相差顕微鏡像であり、下部の2枚は抗MAP2抗体により染色した生存神経細胞の顕微鏡像である。図1左側の2枚はJP (5 ng/mL) を添加して培養したものであり、図1右側の2枚はJP未添加で培養した対照である。

【0014】図1から分かるように、JP未添加で培養した場合の神経細胞はその数も少なく、抗MAP2抗体での染色像で分かるように、神経突起の発達も殆ど見られなかった。これに対しJP共存下培養した場合には、生存している細胞数が多く、その神経突起の形成が促進され神経細胞間のシナプス形成が多く見られた。その軸索構造も極めてよく発達していた。

【0015】この抗MAP2抗体染色により、生存神経細胞の核を判定し単位面積あたりの細胞数を計測した。図2はJP 5 ng/mLを添加した神経細胞と、JP未添加の神経細胞 (対照) の細胞数の経時変化を示したものである。初期培養6時間後のニューロン生存数約55,000 cells/cm<sup>2</sup>は、培養4日目には約8,000 cells/cm<sup>2</sup>と激減していた。これに対し、JP添加した場合にはその生存数の減少は大きく抑制され、培養4日目でも約30,000 cells/cm<sup>2</sup>と50%以上の神経細胞が生存していた。またニューロンに対する生存維持効果は無血清培地に切換えただ直後から観察された。

【0016】図3は各種濃度のJPを添加した場合の、培養開始4日目のニューロン生存数を示す図である。この図から分かるようにニューロンの生存数は、培地に添加したJP濃度が高くなるに従って増加し、ニューロンに対するJPの生存維持効果には明瞭な量-反応関係が認められた。またJPによる生存効果は5 ng/mLでプラトーに達している。このプラトーの値を最大反応とすると、その50%を示すJPの濃度EC<sub>50</sub>は、数ng/mLレベルであることが分かる。上皮増殖因子 (EGF; Epidermal Growth Factor) や、繊維芽細胞増殖因子 (FGF; Fibroblast Growth Factor) は脳のグリア細胞の分裂を促進させるmitogen活性があることが知られているが、いずれもそのEC<sub>50</sub>は100 ng/mLレベルである (Casper et al., J. Neurosci. Res. 30, 372-381 (1991); Knuusel et al., J. Neurosci. 10, 558-570 (1990))。JP (寿命タンパク質) は、これに比較して数十分の一のはるかに低い濃度領域でその活性を発揮するものであった。

【0017】

【発明の効果】以上のように、キロショウジョウバエ由来の寿命タンパク質には、極めて低い濃度で、動物の神経細胞の生存を維持し、またその神経突起の形成を促進していた。従って、この寿命タンパク質を有効成分として含有する本発明の神経細胞生存維持剤は神経細胞の細胞培養、組織培養の培地添加物として有用である。また、神経細胞の変性脱落を抑制するものであるから、神経変性を伴う各種疾患 (例えば神経細胞の変性脱落を主要な病変とするアルツハイマー病や、パーキンソン病など) の治療薬或いは予防薬としての用途が期待できる。

【図面の簡単な説明】

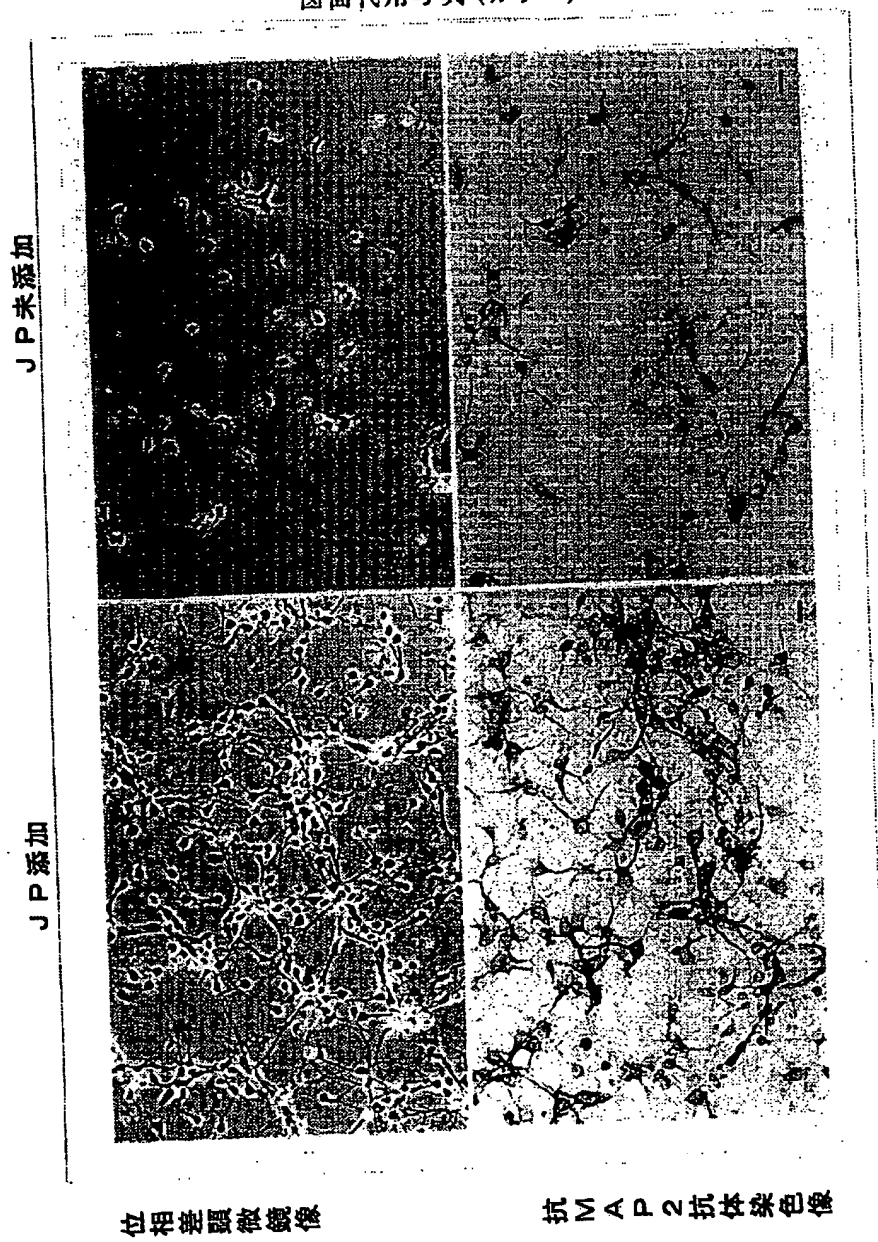
【図1】神経細胞の培養4日目の顕微鏡写真図である。上部2枚の写真は位相差顕微鏡像であり、下部の2枚はMAP2抗体による染色像である。左側はJP (5 ng/mL) 添加して培養したものであり、右側はJP未添加で培養した対照である。各写真の右下に移し込まれたバースケールは10 μmの長さを示す。

【図2】JP 5 ng/mLを添加した神経細胞と、JP未添加の神経細胞 (対照) の生存細胞数の経時変化を示したものである。

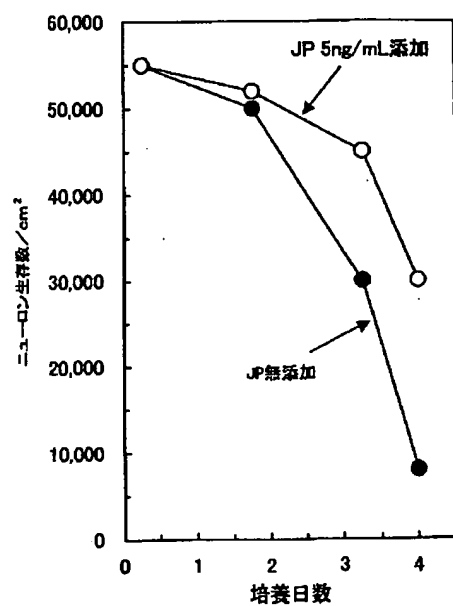
【図3】培養開始後4日目のニューロン生存数と添加JP濃度の関係を示す図である。

【図1】

図面代用写真(カラー)



【図2】



【図3】

